

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-136287
(P2002-136287A)

(43) 公開日 平成14年5月14日 (2002.5.14)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-リ-ド* (参考)
C 1 2 N 15/09		C 1 2 M 1/00	A 2 G 0 4 3
C 1 2 M 1/00		1/38	Z 2 G 0 5 7
1/38		C 1 2 Q 1/68	A 2 G 0 5 8
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 21/03	Z 2 G 0 6 0
G 0 1 N 21/03		21/64	F 4 B 0 2 4

審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 6 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-336303(P2000-336303)

(22) 出願日 平成12年11月2日 (2000.11.2)

(71) 出願人 598160029

伊永 隆史

東京都港区白金台1丁目2番12-1001号

(71) 出願人 598160409

藤井 紳一郎

徳島県徳島市助任本町5丁目14番地3号

(72) 発明者 伊永隆史

徳島県徳島市八万町大坪221番地の1

(72) 発明者 藤井紳一郎

徳島県徳島市助任本町5丁目14番地3号

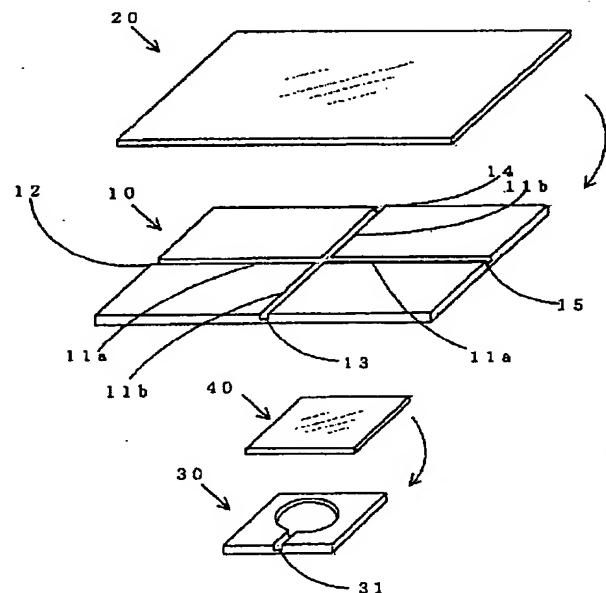
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 物質検出方法及びその装置

(57) 【要約】

【課題】 従来の方法では対象物質検出には大型機器を要し、高価で検出操作も容易でなく、対象物質への汚染、歩留まりの低下があった。

【解決手段】 物質検出方法及びその装置であって、平板状の基板部(10)の一方の面に形成した溝へ低流速ポンプを用いて物質含有溶液を導入することにより、当該物質の基本単位毎に整列せしめ、上記溝に直交ないし交差する溝へ同じく低流速ポンプからの液輸送により物質を分離できる。基板部(10)上面には蓋状部(20)を貼り合わせ、閉鎖系での物質処理を可能とする。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 任意の環境中に存在する分子、イオン、粒子等の物質を、気液相変換、固液相変換、液液相変換などの手段により、所定の液相中に存在せしめ、低流速の液輸送により物質含有溶液を流動せしめ、一物質毎に整列せしめた後、当該物質を連続的に検出分別することを特徴とする物質検出方法及びその装置。

【請求項2】 上記の手法を用い液相中に含まれる特定の物質を検出するための装置であって、平板状の基板部の一方の面に、当該物質含有溶液が流れる一流路及び／又は複数流路の連続した溝を形成し、さらにその溝と直角方向ないし交差する物質移動用溝を形成し、その溝を閉封するように上面に蓋状板を接合することを特徴とする物質検出方法及びその装置。

【請求項3】 上記の手法を用い液相中に含まれる特定の物質を検出するための装置であって、迅速な物質拡散と高感度な物質検出分別を可能とするために、微小空間及び／又は短距離に設定した溝に低流量で微量の当該物質を導入することを特徴とする物質検出方法及びその装置。

【請求項4】 上記物質検出方法及びその装置であって、密着した基板部及び蓋状部を有することにより、装置内部が外部環境に対して閉鎖環境及び／又は無菌環境となることを特徴とする物質検出方法及びその装置。

【請求項5】 一物質毎に整列せしむるために、所定の微小空間の任意区間を低流速で流動せしめ、基板部に構築された溝及び／又はその溝と直交ないし交差する物質移動用溝への物質流入せしめ、液輸送に低流速・定常流ポンプを用いることを特徴とする請求項1から3のいずれかに記載の物質検出方法及びその装置。

【請求項6】 上記物質の含有溶液を希釈及び／又は化学反応せしむるために、初期溶液導入溝の下流域に試薬導入溝を形成することを特徴とする請求項1から3のいずれかに記載の物質検出方法及びその装置

【請求項7】 当該物質の移動用溝を通過した物質を処理及び／又は操作及び／又は検出及び／又は分別及び／又は物質の処理をせしめるために上記物質移動用溝の途中及び／又は末端にプールを形成することを特徴とする請求項1から3のいずれかに記載の物質検出方法及びその装置。

【請求項8】 上記プールに移送された当該物質について、核酸合成酵素含有溶液添加及びその酵素反応と精密な温度管理により、当該物質由来遺伝子情報を検索することを特徴とする請求項1から3のいずれかに記載の物質検出方法及びその装置。

【請求項9】 当該物質の整列及び／又は検出及び／又は分別を定常的にせしめるために、上記基板部及び／又は蓋状部の周囲ないし全体に温度調節手段を設けることを特徴とする請求項1から3のいずれかに記載の物質検出方法及びその装置。

【請求項10】 当該物質由来遺伝子情報の検索及び／又は当該物質の処理及び／又は操作及び／又は検出及び／又は分別するための核酸合成酵素含有溶液を添加及び／又は化学物質を混合せしめるために異なる溝を形成することを特徴とする請求項1から3のいずれかに記載の物質検出方法及びその装置。

【請求項11】 当該物質含有溶液及び／又は別に導入する化学物質を希釈せしめるために溝の途中及び／又は末端にプールを設けることを特徴とする請求項1から3のいずれかに記載の物質検出方法及びその装置。

【請求項12】 当該物質の検出方法として蛍光検出及び／又は吸光検出及び／又は電気化学検出及び／又は電導度検出及び／又は光熱変換検出を用いることを特徴とする請求項1から3のいずれかに記載の物質検出方法及びその装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は液相中に含まれる特定の物質を検出せしめるための方法及びその装置に関する。

【0002】

【従来の技術】例えば任意の一細胞を分離検出する場合、従来はガラスキャピラリーを用いて熟練した手作業による分離を行った後に細胞増殖を行い細胞情報を検出するか、ハイブリドーマ法を用いた淘汰型細胞選択法による純粋細胞培養を数ヶ月間に渡って行うか、フローサイトメトリー装置を用いて一細胞分離を行った後に細胞増殖を行い細胞情報を検出する方法を用いることにより細胞検出を行うことができていた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】このような方法では、手作業による外的汚染に起因して得られる細胞情報の歩留まりが悪く、熟練した作業員を養成する必要がある、純粋細胞培養を行うために数ヶ月間という長期間を要し、その間に培養に必要なランニングコストが高い、高価で大型なフローサイトメトリー装置が必要で、消費電力等ランニングコストも高く、利用するための高度な技術を要し、フローサイトメトリー装置は高速送液を特徴とするため細胞分離能低下が顕著となるといった課題があった。

【0004】従って本発明は上述した課題を解決することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明は任意の環境中に存在する分子・イオン・粒子等の物質を検出するための方法及び装置であって、その基本方法は請求項1に示すように、物質を、気液相変換、固液相変換、液液相変換などの手段により、所定の液相中に存在せしめ、低流量の輸送により物質含有溶液を輸送し、一物質毎に整列せしめた後、初期物質輸送方向とは直角ないし交差する方

向へ低流量で輸送を行うことにより、当該物質を連続的に検出分別し、その基本構造は請求項2に示すように、平板状の基板部の一方の面に、当該物質含有溶液が流れる一流路及び／又は複数流路の連続した溝を形成し、さらにその溝と直角方向ないし交差する物質移動用溝を形成し、その溝を閉封するように上面に蓋状板を接合することを特徴とする。

【0006】

【作用】上記溝に当該物質含有溶液及び／又は液相交換用溶媒を低流量・定常流ポンプを用いて流入せしめ、微小空間を特徴とする基板の溝構造により導入溶液は層流となり、線流速の速い溝中心部分へ向けて当該物質の基本単位毎に整列される。又、基板自体の立体構造的及び／又は基板構造上に塗布又は充填した分離機能を有する高分子材料により特定物質の基本単位毎に整列される。

【0007】その分離された当該物質は、初期導入分離用溝と直角方向へ交差した溝に低流量で輸送を行うことにより検出分別を含む物質処理用の溝及び／又はプールへ移送される。物質を検出プールへ移送する際には初期導入溝方向は輸送を中止する及び／又は検出プール方向へ減圧する方法を用いることにより、逆方向への流入を阻止することが可能となる。初期溶液の希釈及び／又は試薬導入による化学反応は請求項2及び／又は6に示すような初期導入溝下流域における別な溝による希釈及び／又は試薬混合により可能となる。

【0008】また、物質整列及び／又は物質由来情報の増幅は請求項8に示すようにそれらの操作を定常的に行うために、上記基板部及び蓋状部及び／又は物質処理用プールの周囲全体に温度調節手段を設けている。請求項2及び／又は6に示したように核酸合成酵素含有溶液を添加及び／又は混合するために別の溝を形成することで、細胞由来遺伝子情報を検索するための酵素含有溶液添加が可能となり、上記温度調節手段を利用することで、その酵素反応を進行することが可能となる。

【0009】

【本発明の実施の形態1】図1は、本発明の実施形態における1例を示した物質検出方法及びその装置1の分解斜視図である。この物質検出方法及びその装置1は一細胞分離を目的とした装置で、石英製の基板部10と、基板部10の上面に貼り付けられる石英製の蓋状部20、細胞分離を行った後の物質由来遺伝子情報増幅処理用プール基板部30とその蓋上部40からなる。

【0010】基板部10の大きさは例えば縦20mm、横40mmで高さは1mmである。その基板部10の上面には、上述した溝として例えば深さ100μmで幅20μmの底面が平坦な凹型の形状をなす液相移動溝11が形成される。蓋状部20の大きさは基板部と同じく例えば縦20mm、横40mmで高さは1mmである。プール基板部30の大きさは例えば縦20mm、横20mmで高さは1mmである。プール基板部30の上面に接

する面にも基板部と同様に蓋状部40が張り付けられ、その大きさはプール基板部30と同じく例えば縦20mm、横20mmで高さは1mmである。

【0011】基板部10の上面で縦方向中央に長辺方向へ貫く溝11aが形成され、その溝に交差する方向で横方向中央に単辺方向へ貫く溝11bが形成されている。これらの溝11a、11bの基板端面部をそれぞれ液相注入口12、移送用溶液注入口13、物質取り出し口14、液相取り出し口15と呼ぶ。プール基板部30上面には分離物質導入溝30aが形成され、その溝30aのプール基板端面部を分離物質導入口31と呼ぶ。

【0012】液相移動溝11の一端は、物質取り出し口14から分離物質導入口31を経て物質由来遺伝子情報増幅処理用プール30へ繋がり、移送用溶液と共にプール内部へ物質を移動させる。

【0013】図2は実施の形態1の輸送状態の模式図を示しており、細管内輸送では図2上図に示すとおり細管中心部の流速が最も速くなるため、図2下図に示すとおり溝内部でも同様の中心部への集約が認められる。

【0014】

【発明の実施の形態2】図3は本発明の実施形態における1例を示したT細胞（直径約10μm）の検出方法及びその装置2の斜視図および構成図である。この物質検出方法及びその装置2はT細胞の一細胞分離を目的とした装置で、石英製の基板部10と、基板部10の上面に貼り付けられる石英製の蓋状部20、細胞分離を行った後のT細胞由来遺伝子情報増幅処理用プール基板部30とその蓋上部40からなる。

【0015】基板部10の大きさは例えば縦20mm、横40mmで高さは1mmである。その基板部10の上面には、上述した溝として例えば深さ100μmで幅20μmの底面が平坦な凹型の形状をなす液相移動溝11が形成される。蓋状部20の大きさは基板部と同じく例えば縦20mm、横40mmで高さは1mmである。プール基板部30の大きさは例えば縦20mm、横20mmで高さは1mmである。プール基板部30の上面に接する面にも基板部と同様に蓋状部40が張り付けられ、その大きさはプール基板部30と同じく例えば縦20mm、横20mmで高さは1mmである。

【0016】基板部10の上面で縦方向中央に長辺方向へ貫く溝11aが形成され、その溝に交差する方向で横方向中央に単辺方向へ貫く溝11bが形成されている。これらの溝11a、11bの基板端面部をそれぞれ液相注入口12、移送用溶液注入口13、物質取り出し口14、液相取り出し口15と呼ぶ。プール基板部30上面には分離物質導入溝30aが形成され、その溝30aのプール基板端面部を分離物質導入口31と呼ぶ。

【0017】T細胞含有溶液保管槽50から輸送用低流速ポンプ60を用いて輸送されたT細胞含有溶液は、液相注入口12へ導かれ請求項1に従って整列される。整

列されたT細胞は移送用溶液保管槽70から移送溶液輸送用低流速ポンプ80を用いて輸送された移送用溶液は整列されたT細胞を物質取り出し口14方向へ吐出し、T細胞はT細胞由来遺伝子情報増幅処理用プール基板部30へ送られ、請求項8に従って遺伝子情報増幅が行われる。

【0018】

【発明の実施の形態3】図4は、DNA分子を蛍光染色せしめたもの（長辺約10 μ m）を幅20 μ mの上記溝へ低流速ポンプを用いて流入せしめ、蛍光顕微鏡を用いて観察したもので、90がDNA分子である。初期導入条件では均一に懸濁し、溝幅全体に存在せしめたが、請求項1に従い、低流速で輸送することにより一列に整列せしめた。

【発明の実施の形態4】図5は、精子を蛍光染色せしめたもの（全長約50 μ m、染色部長さ約15 μ m）を幅100 μ mの上記溝へ低流速ポンプを用いて流入せしめ、蛍光顕微鏡を用いて観察したもので、100が精子である。初期導入条件では均一に懸濁し、溝幅全体に存在せしめたが、請求項1に従い、低流速で輸送することにより一列に整列せしめた。

【発明の効果】以上説明したように、本発明は、平板状の基板部の一方の面に、一流路及び／又は複数流路の連続した溝を形成し、さらにその溝と直角方向ないし交差する物質移動用溝を形成し、その溝を閉封するように上面に蓋状板を接合することを特徴とする物質検出方法及びその装置であり、シンプルな構造のために小型、安価で、測定対象の試料は極少量で済む。又、閉鎖系、滅菌系で行うため、分離物質への汚染を防ぐことができ、分*

* 離歩留まりが向上する。当該物質の処理及び／又は当該物質由来遺伝子情報の検索及び／又は操作及び／又は検出及び／又は分別するための核酸合成酵素含有溶液を添加及び／又は化学物質を混合せしめるために異なる溝を形成することができ、簡易な操作で物質処理を行うことが可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の物質検出方法及びその装置の分解斜視図

10 【図2】 図1の物質検出方法及びその装置の輸送状態の模式図

【図3】 本発明の物質検出方法及びその装置の別の実施形態を示した図

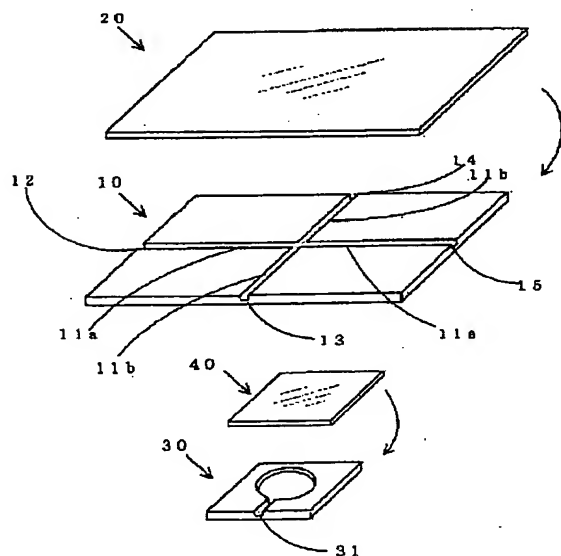
【図4】 本発明の物質検出方法及びその装置の別の実施形態を示した図

【図5】 本発明の物質検出方法及びその装置の別の実施形態を示した図

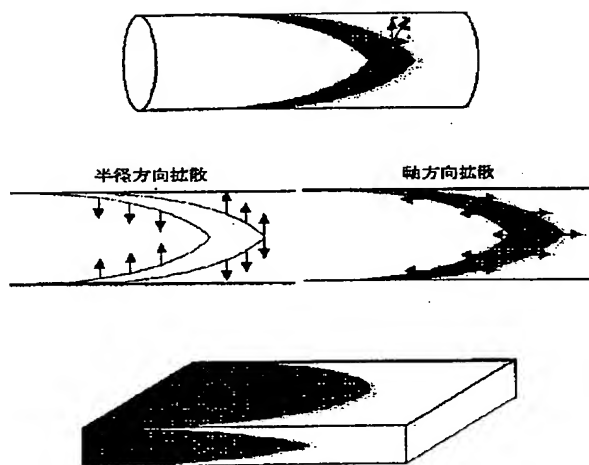
【符号の説明】

- 1 物質検出方法及びその装置
- 10, 30 基板部
- 11, 11a, 11b, 30a 溝
- 12, 13, 31 注入口
- 14, 15 取り出し口
- 20, 40 蓋状部
- 50, 70 保管槽
- 60, 80 ポンプ
- 90 DNA分子
- 100 精子

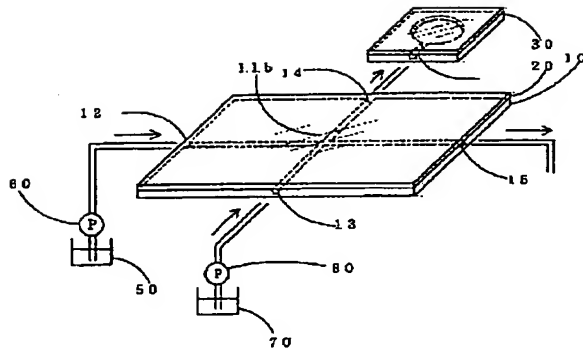
【図1】



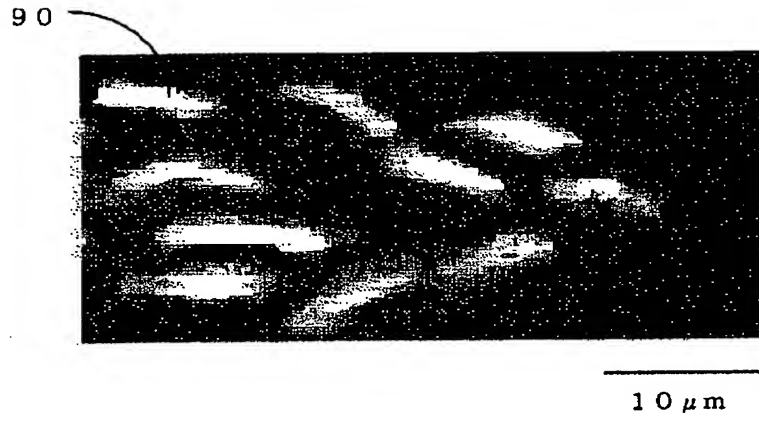
【図2】



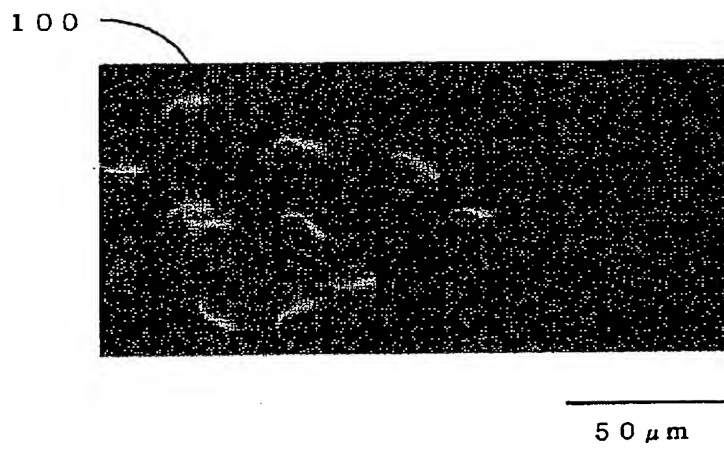
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ターム(参考)
G 0 1 N 21/64		G 0 1 N 21/64	E 4 B 0 2 9
27/06		27/06	Z 4 B 0 6 3
27/26		27/26	Z
33/53		33/53	M
35/08		35/08	Z
37/00	1 0 1	37/00	1 0 1
// C 1 2 M 1/34		C 1 2 M 1/34	Z
		C 1 2 N 15/00	F
			A

F ターム(参考) 2G043 AA03 BA16 CA03 DA02 EA01
 FA02 GA07 GB21 LA01
 2G057 AA04 AC01 BA01 BB02 CB03
 2G058 AA01 AA02 BA01 BB02 BB08
 BB09 DA07 DA09 EA05 EB00
 FA07 GA02 GA11 GA20 HA01
 2G060 AA06 AD06 AE20 AE40 AF08
 EB01 GA04 HB06 HC07 HD01
 KA10
 4B024 AA11 CA09 HA12
 4B029 AA07 AA08 BB11 BB16 FA12
 GB10
 4B063 QA01 QQ03 QQ08 QQ42 QR08
 QR32 QR56 QS12 QS24 QS34
 QX02 QX04

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10574

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12M1/34, C12Q1/04, G01N35/08, G01N37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12M1/00-C12M3/10, C12Q1/00-C12Q3/00, G01N35/00-G01N37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTplus (JOIS), CA/REGISTRY/BIOSIS/MEDLINE/WPI (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99/33559 A1 (Cepheid), 08 July, 1999 (08.07.99), & JP 2001-527220 A & EP 1179585 A2 & US 6368871 B1	1-9
A	WO 99/47922 A2 (Massachusetts Institute of Technology), 23 September, 1999 (23.09.99), & EP 1064353 A1 & US 6197575 B1	1-9
A	JP 2002-136287 A (Takashi KORENAGA), 14 May, 2002 (14.05.02), (Family: none)	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
03 October, 2003 (03.10.03)Date of mailing of the international search report
14 October, 2003 (14.10.03)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.